

**ISOLIERUNG EINES REZEPTORPROTEINS FÜR
LYMPHOZYTENSPEZIFISCHE ZYTOTOXISCHE
ANTIKÖRPER AUS DER MEMBRAN MENSCHLICHER
LYMPHOZYTEN**

von
Horst-Rüdiger Hilmar Krömker
aus
Hirschau

1976 # 239

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

**ISOLIERUNG EINES REZEPTORPROTEINS FÜR
LYMPHOZYTENSPEZIFISCHE ZYTOTOXISCHE
ANTIKÖRPER AUS DER MEMBRAN MENSCHLICHER
LYMPHOZYTEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Horst-Rüdiger Hilmar Krömker
aus
Hirschau

Aus der Abteilung für Klinische Immunologie
des Universitätsklinikums Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg

ISOLIERUNG EINES REZEPTORPROTEINS FÜR
LYMPHOZYTENSPECIFISCHE ZYTOTOXISCHE
ANTIKÖRPER AUS DER MEMBRAN MENSCHLICHER
LYMPHOZYTEN



Dekan : Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent : Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung : 29. März 1976

Heist-Rüdiger Hilmer Kömker

Hilmer

Isolierung eines Rezeptorproteins für Lymphozyten-
spezifische zytotoxische Antikörper aus der Mem-
bran menschlicher Lymphozyten

Gliederung

1. Einleitung
2. Material und Methode
 - 2.1 Zellextraktion
 - 2.2 Gelfiltration der Zellrohextrakte
 - 2.3 Analytische PAA-Disc-Elektrophorese
 - 2.4 Präparative PAA-Disc-Elektrophorese
von Membranrohextrakt
 - 2.5 Immunologische Analyse
 - 2.5.1 Präcipitationsreaktionen
 - 2.5.2 Zytotoxizitätsinhibitionsteste
3. Ergebnisse
4. Diskussion
5. Zusammenfassung

1.1. Einleitung

Seit der Veröffentlichung von Medawar im Jahre 1963 (1) über lösliche Antigene der Zellmembran wurden viele Versuche unternommen, Oberflächenantigene von Zellen zu isolieren und zu charakterisieren.

Dazu mußten diese Körper möglichst schonend aus oder von der Membran gelöst werden.

Die Autoren benutzten zu diesem Zweck Beschallung mit niedrigfrequenter Energie und konnten so z.B. wasserlösliche Histokompatibilitätsantigene aus verschiedenen Organen und Zellen gewinnen (2, 3, 4, 5, 6).

Nach Reisfeld und Kahan (7) wird durch kurze Behandlung mit Schall niedriger Energie aus einer Suspension von Maus- oder Meerschweinchenzellen 12 bis 15 % des gesamten immunogenen Materials wasserlöslich gewonnen.

Hochenergetischer Schall (Ultraschall) löst zwar auch Antigene aus der Zellmembran ab; dieses Material ist aber nach kurzer Zeit immunologisch inaktiv.

In einem anderen Verfahren wurden wasserlösliche Membranantigene durch Proteolyse gewonnen.

Nathenson und Davies (9) versuchten Histokompatibilitätsantigene durch Autolyse von Zellen freizusetzen. Nachteilig war hier die geringe Ausbeute an immunogenem Material (1 - 2%).

Die so gewonnenen Bestandteile besaßen ein hohes Molekulargewicht und enthielten sämtliche antigenen Spezifitäten der ursprünglichen Zelle. Eine Behandlung von Membranen mit Papain (10,11) oder Trypsin (12) kann ebenso dazu dienen, Membranantigene zu lösen. Hier werden zwar größere Mengen an gelöstem Material erhalten, gleichzeitig aber auch eine Reihe spezifischer Antigene proteolytisch zerstört (13). Mit Detergentien wie Triton X 100 (14, 15), Desoxycholat (16), Natriumdodecylsulfat (17) und organischen Lösungsmitteln wie Butanol (18,19) gelang es ebenfalls, antigenes Material aus Membranen zu isolieren. Es war jedoch schwierig, die so gewonnenen Körper zu charakterisieren, da sie ihre funktionellen und immunologischen Eigenschaften weitgehend verloren hatten.

Ein Verfahren, das eine hohe Effektivität ohne gleichzeitige Denaturierung der gelösten Membranproteine bietet, wurde von Reisfeld und Kahn (20, 21) im Jahre 1970 vorgeschlagen. Durch Extraktion mit 3 M Kaliumchlorid lassen sich bis zu 40 % des antigenen Materials in wasserlösliche Form bringen. In dem extrahierten Material finden sich - wie an den Histokompatibilitätsantigenen der Maus und des Menschen gezeigt werden konnte - sämtliche zelleigenen antigenen Spezifitäten (20,22).

Durch Behandlung mit hochmolaren Salzlösungen werden vor allem heteropolar gebundene Proteine aus und von der Zellmembran extrahiert. Diese Proteine sind zum großen Teil Träger membranspezifischer antigenen Eigenschaften (23). Die Strukturproteine der Membran bleiben bei diesem Extraktionsverfahren unberührt. Ziel der vorgelegten Untersuchung war, durch 3 M KCl - Extraktion solche Antigene von Lymphozytenmembranen abzulösen und zu isolieren, die spezifisch mit Antikörpern gegen Lymphozyten reagieren und die zytotoxische Aktivität dieser Antikörper zu hemmen vermögen.

2. Material und Methode

2.1. Zellextraktion

Menschliche Lymphozyten wurden aus normaler Milz oder normalem Thymus gewonnen, die während abdominaler oder thorakaler Operationen in der chirurgischen Universitätsklinik Erlangen entfernt worden waren. Die Kapsel der Organe wurde entfernt und das Gewebe in kleine Stücke zerschnitten. Danach homogenisierte man die Gewebs-

stücke in einem Glashomogenisator und suspendierte die Zellen in Hank's Lösung, die 5 % AB-Serum enthielt, bei 4⁰ C. Trennung der Lymphozyten von Erythrozyten erfolgte durch Zentrifugation in einem Ficoll-Hypaque-Gradienten ($d = 1.077$) bei 250 g / 40 Min.. Die Milzzellsuspension enthielt 20 - 50 % Erythrozyten. Die Lymphozyten stellten kleine bis mittelgroße Zellen dar. Im Trypanblauexklusionstest waren mehr als 95 % der Zellen vital.

Die Extraktion der Membranproteine wurde nach dem Verfahren von Meltzer et al. (30) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in Folge zweimal mit Hank's Lösung und einmal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurden je 5×10^8 Lymphozyten in 10 ml 3 M KCl-Lösung in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 über 18 Stunden suspendiert. Anschließend zentrifugierte man die Suspension bei 40.000 g / 60 Min. (Beckman, Spinco L2) und dialysierte den Überstand zweimal für je eine Stunde gegen das zweihundertfache Volumen deionisierten Wassers. Es bildete sich ein weißer, gelatinöser Niederschlag, der ebenfalls bei 40.000 g / 15 Min. abzentrifugiert wurde. Den Überstand konzentrierte man mit Hilfe eines Membranfilters (Minicon - 15, Deutsche Amicon GmbH, Witten/Ruhr) bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 170 mg/ml.

Sämtliche Präparationsschritte wurden bei 4° C durchgeführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei 215,5 / 225 nm (29) mit Rinderserumalbumin als Standard.

Der Extrakt konnte ohne Verlust seiner antigenen Eigenschaften bei 4° C einige Wochen, bei - 60° C über mehrere Monate aufbewahrt werden.

Humane Erythrozyten der Blutgruppe O rh neg. wurden in Aqua dest. lysiert und die Membranen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung solange gewaschen bis nach Zentrifugierung bei 40.000 g / 30 Min. ein farbloses Sediment erhalten wurde. Diese Membranen wurden nach der 3 M KCl-Methode extrahiert.

Membranantigene menschlicher Colonkarzinomzellen wurden aus den Zellen der etablierten Colonkarzinomlinie C 373 ebenfalls nach dem 3 M KCl - Extraktionsverfahren gewonnen.

2.2. Gelfiltration der Zellrohextrakte

Der so gewonnene Proteinextrakt wurde an einer mit 0.1 M Phosphatpuffer pH 7,4 äquilibrierten Sephadex G 200 - Säule (d = 2,5 cm, l = 50 cm, Durchflußrate = 15 ml/h) weiter aufgetrennt und das Eluat über einen Fraktionssammler aufgefangen.

Optische Kontrolle erfolgte bei 254 nm über ein registrierendes Durchflußphotometer (Uvicord II). Sämtliche verwendeten Geräte stammten von LKB-Producter / Stockholm.

Korrespondierend zur erhaltenen Elutionskurve wurde der gesamte Elutionsbereich in drei Hauptfraktionen (F1, F2 und F3) aufgeteilt (s.Abb.1).

2.3. Analytische PAA-Disc-Elektrophorese

Die Proteine der unter 2.2. erhaltenen Hauptfraktionen F1,F2,F3,sowie reiner Membranextrakt, wurden über die analytische PAA-Disc-Elektrophorese (Gelsystem Nr. 1a nach Maurer (24)) weiter aufgetrennt.

Beim Start mischte man 100 - 150 µg Protein des Membranextraktes mit 100 µl Sammelgellösung und trug diese Menge auf das Gel auf. Bei Einwanderung der Substanzen in das Sammelgel betrug die Stromstärke 0,5 - 1 mA pro Röhrchen.Sie wurde im Trenngel auf maximal 4 mA/Gelröhrchen gesteigert. Die Laufstrecke im Trenngel betrug einheitlich 75 mm.Die Temperatur betrug während des Laufs 4° - 8° C.

Bei Ende der Trennung wurde das Trenngel an der Pufferfront abgeschnitten und in 7 %iger Essigsäure mit 1 % Amidoschwarz 10 B für 90 Min. gefärbt. Entfärbung erfolgte in 7 %iger Essigsäure unter Sicht.

Neben der Amido-Schwarz-Färbung wurden spezielle Färbemethoden für kohlenhydrathaltige (25) und eisenhaltige Proteine (26) eingesetzt.

2.4. Präparative PAA-Disc-Elektrophorese von Membranrohextrakt

Um einzelne Proteinbanden aus den Gelen zu isolieren, wurden beladene, ungefärbte Standardgele (Länge 8,5 cm; Trenngel 8 cm; Sammelgel 0,5 cm; Laufstrecke 7,5 cm; Proteinbeladung 150 μ g) mittels Messersatz in 0,5 cm lange Stücke zerschnitten und einzeln in einem Glashomogenisator zerrieben.

Die enthaltenen Proteine eluierte man durch zweifache Zugabe von je 5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung. Anschließend wurden die Gelbestandteile durch Zentrifugation (40.000 g / 30 Min.) entfernt und der Überstand in einem Minicon Filter M-15 auf einen Proteingehalt von ca. 15 - 20 mg/ml eingeengt.

Auf diese Weise konnte ein einzelnes Gelstäbchen in 16 verschiedene Bereiche zerschnitten und die darin enthaltenen Proteine eluiert bzw. ankonzentriert werden (Fraktionsbezeichnung: E1 - E16, gerechnet von dem Beginn des Gels).

2.5. Immunologische Analyse

Unfraktionierter KCl-Extrakt von Milz- und Thymuszellen als Ausgangsmaterial, die unter 2.2. gewonnenen Fraktionen F1 - F3 und die unter 2.4. jeweils eluierten Anteile E1 - E16 wurden in Folge immunologisch analysiert.

Diese Proteinanteile wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, Präcipitationsreaktionen mit verschiedenen Antilymphozytenseren zu bilden und die Zytotoxizität dieser Antilymphozytenseren zu hemmen. Die zugehörigen Antilymphozytenseren gegen menschliche Lymphozytenpräparationen stellten die Behringwerke in Marburg zur Verfügung.

Folgende Antiseren wurden eingesetzt:

1. Antiserum gegen Milzzellen
2. Antiserum gegen Thymuszellen
3. Antiserum gegen Lymphknotenzellen
4. Antiserum gegen Ductus-thoracicus-Lymphozyten
5. Antiserum gegen B-Kulturlymphoblasten
6. Antiserum gegen menschliches Immunglobulin und das gesamte menschliche Serumprotein.

Die Antilymphozytenseren stammten vom Pferd, die anderen Antiseren vom Kaninchen oder von Ziegen.

2.5.1. Präcipitationsreaktionen

Die Präcipitationsfähigkeit der unter 2.1. bis

2.4. gewonnenen Proteine wurde im Agarimmun-diffusionstest nach Ouchterlony (27) untersucht. Bedingungen: 1,5 %iger Agar in NaBarbital - HCl - Puffer, pH 8,0; radiale Beckenanordnung (Beckendurchmesser 2 mm) auf Objektträger unter Verwendung von Stanzen (LKB-Standardapparatur). Nach Inkubation über 48 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Ergebnisse abgelesen. Überschüssiges Antiserum entfernte man durch Wäsche mit physiologischer Kochsalzlösung, dann wurde mit Amidoschwarz 10 B gefärbt.

2.5.2. Zytotoxizitätshemmtest

Für die folgenden Untersuchungen verwendete man als Targetzellen:

1. Lymphozyten aus dem peripheren Blut, die in einem Ficoll - Hypaque - Gradienten von Erythrozyten getrennt worden waren.

2. T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut, die nach Julius et al. (28) per Passage durch eine 10 cm lange Nylonwollsäule in RPMI 1640 - Medium mit 2,5 % AB-Serum gewonnen wurden.

Die passierten Zellen bildeten zu 93 - 95 % E-Rosetten (31).

3. Thymuszellen aus normalem, operativ entfernten Thymus.

Für einen Test suspendierte man 100.000 Targetzellen in 10 µl Hank's Lösung mit 2 % Rinder-

serumalbumin und inkubierte anschließend mit 0,1 ml einer geometrischen Verdünnungsreihe von verschiedenen Antilymphozytenseren über 20 Min. bei Raumtemperatur. Danach wurden 0,1 ml Kaninchenserum als Komplementquelle zugegeben und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Der zytotoxische Titer wurde im Trypanblau - Exclusionstest bestimmt.

Als positiv war die zytotoxische Reaktion dann anzusehen, wenn 20 % mehr tote Zellen gezählt wurden als in der Kontrolle.

In den Kontrollen wurden die Targetzellen nur mit Komplement oder mit unspezifischen Pferdegammaglobulin und Komplement inkubiert. Im Durchschnitt waren 3 - 7 % tote Zellen in den Kontrollen zu finden.

Um die Antiseren mit den isolierten Membranproteinen zu absorbieren wurden diese im Verhältnis von 0,1 ml Antiserum zu 50 mg Proteinpräparation bei 4°C für 18 Stunden vorinkubiert. Entstandene Präcipitate zentrifugierte man über 20 Min bei 20.000 g ab.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Chromatographie

Chromatographiert man Membranproteine aus Milzzellen an Sephadex G 200, so erhält man das in Abbildung 1 wiedergegebene Elutionsprofil. Proteine hohen Molekulargewichts erscheinen in Fraktion 1 (F1). Die Fraktion 2 (F2) repräsentiert ca. die Hälfte der gesamten aufgegebenen Proteinmenge. Hier finden sich neben anderen Proteinen Hämoglobin aus den Erythrozyten, die in der Milzzellsuspension noch vorhanden waren. Das Hämoglobin wurde mit der Benzidinreaktion nach Clarke (26) identifiziert.

Fraktion 3 (F3) besteht aus Proteinen niedrigen Molekulargewichts.

Bei der Auftrennung von Thymuszellmembranextrakt an der Sephadex G 200 -Säule zeigt sich ein größerer Anteil von Proteinen, die in der Fraktion 1 eluiert werden.

Werden unter gleichen Bedingungen statt Extrakten von Milzzellmembranen oder Thymuszellmembranen solche von Erythrozyten aufgetrennt, so werden im Bereich der Fraktion 1 keine Proteine eluiert.

3.2. Ergebnisse der PAA-Disc-Elektrophorese

Wie Abbildung 2 zeigt, sind aus Milzzellmembranen durch eine analytische Disc-Elektrophorese nach Vortrennung an Sephadex G-200 mehr als 25 diskrete Proteine differenzierbar. Mit Hilfe von Spezialfärbungen konnten in den Gelen eisenhaltige und kohlenhydrathaltige Proteine identifiziert werden. Das breite Band in der Mitte des Gels entspricht dem Hämoglobin. Ein Glykoprotein ließ sich am Übergang vom Sammel- zum Trenngel nachweisen. Das in der Fraktion F2 am schnellsten wandernde Protein zeigt ebenfalls eine schwache Anfärbung bei Anwendung der glykoproteinspezifischen Färbemethode (25).

Vergleicht man die Muster der Membranproteine von Lymphozyten und Erythrozyten, so zeigt sich eine sehr unterschiedliche Bandenverteilung der Proteine. Nur das Hämoglobin erscheint in beiden Fällen an gleicher Stelle. Auffällig ist der Mangel an höher-molaren Proteinen beim Erythrozyten-Extrakt.

Durch Auftrennung von Milzzellenmembranextrakt in analytischer Disc-Elektrophorese, Zerteilung des Gels in 5 mm-Partikel (E1 - E16) und Rückgewinnung der in den einzelnen Gelstücken

enthaltenen Proteine, lassen sich diskrete Proteinbanden anreichern. Eine Reelektrophorese dieser so gewonnenen Proteinanteile gibt Abbildung 3 wieder. Sie beweist, daß nach diesem Verfahren eine weitgehende Differenzierung einzelner Membranproteine erreicht wird.

3.3. Ergebnisse der Immunpräzipitation

Rohextrakte aus Milz- und Thymuszellmembranen und die über Gelfiltration bzw. präparative PAA-Disc-Elektrophorese gewonnenen fraktionierten Proteinanteile zeigten, in den nachfolgenden immunologischen Untersuchungen, folgende Charakteristika:

Unfraktionierter Milzzellextrakt bildet mit einem Antimilzzellserum 6 Präcipitationslinien (Abb.4). Drei dieser Linien kreuzreagieren mit den Präcipitationslinien des Antithymuszellserums, des Anti-Ductus-thoracicus-Lymphozytenserums und des Antilymphknotenzellserums.

Kreuzreaktionen ergaben sich ebenfalls mit dem Anti-B-Kulturlymphoblastenserum. Eine schwache Reaktionslinie zeigte sich mit dem Antiimmunglobulinserum (s.Abb.7).

Der Thymuszellextrakt wies ein anderes Präcipitationsmuster auf (Abb.5). Mit dem Antithymus-

zellserum ergibt sich eine starke Linie, die mit anderen hier eingesetzten Antiseren nicht entsteht. Mit Antimilzzellserum, Anti-B-Kulturlymphoblastenserum, Antilymphknotenzellserum und Anti-Ductus-thoracicus-Lymphozytenserum zeigt der Thymuszellextrakt dagegen zwei Präcipitationslinien, die mit Antithymuszellserum nicht gebildet werden.

Untersucht man die an der Sephadex G200-Säule getrennte Fraktion F1 im Immundiffusionstest (Abb.6), so präcipitierte sie mit allen untersuchten Antiseren unter Ausbildung einer oder zwei Reaktionslinien. Fraktion 2 (F2) gleicher Herkunft reagierte mit 2 - 3 Reaktionslinien. Nur Fraktion 3 (F3) ergibt eine negative Reaktion.

Im Vergleich dazu zeigen Membranproteine, die durch präparative Auftrennung in der PAA-Disc-Elektrophorese gewonnen wurden, folgende Präcipitationsreaktionen:

Die Fraktionen E2, E3 und E4 reagieren in einer starken Linie mit Antimilzzellserum. Diese Linie ist nicht identisch mit der, die mit Anti-Ductus-thoracicus-Lymphozytenserum und Antithymuszellserum entsteht. E2 enthält ferner ein Protein, das mit Antiimmunglobulinserum reagiert.

Mit der Fraktion E6 reagieren alle Antiseren mit Ausnahme des Antiimmunglobulinserums.

Die Fraktionen E10 und E11 enthalten ein Protein, das mit Antimilzcellserum eine deutliche Reaktionslinie ergibt. Die Fraktion E13 bildet eine feine Reaktionslinie mit Antithymuscellserum und Anti-Ductus-thoracicus-Lymphocytenserum.

Mit Colonkarzinomextrakt reagiert kein Antiserum, mit Erythrocytenmembranextrakt nur das Antimilzcellserum mit einer schwachen Reaktionslinie.

3.4. Ergebnisse der Zytotoxizitätshemmteste

Die Inhibition der Zytotoxizität von Antilymphocytenseren nach Inkubation mit KCl-Extrakten ist in Abbildung 8 dargestellt.

Antimilzcellserum hat einen zytotoxischen Titer von 1:4000 gegen Lymphocyten des peripheren Blutes.

Nach Inkubation mit unfraktioniertem Milzcellextrakt sinkt der Titer auf 1:128. Bei Trennung der Membranproteine durch Geldiffusion findet sich die inhibierende Aktivität in Fraktion 1 (F1), nur zu einem geringen Teil in Fraktion 2 (F2). Verwendet man die gesamte Population der peripheren Lymphocyten als Targetzellen, so wirkt der Thymuscellextrakt kaum inhibierend auf Antimilzcellserum. Der Effekt dieses Extraktes konnte verstärkt werden, wenn gereinigte T-Lymphocyten als Targetzellen benutzt wurden. Bei Verwendung von Thymuszellen als Targetzellen steigt der zytotoxische Titer des Antimilzcellserums um 2 Stufen. Milzcellextrakt inhibiert hier nicht,

Thymuszelleextrakt dagegen hemmt.

Die Zytotoxizität von Antithymuszellserum gegenüber der Gesamtpopulation der peripheren Lymphozyten läßt sich durch Milzzelleextrakt nur leicht hemmen. Bei Verwendung gereinigter T-Zellen ist die inhibitorische Wirkung beider Extrakte stärker. Bei Thymuszellen als Targetzellen steigt der zytotoxische Titer. Der Milzzelleextrakt hat hier keinen inhibitorischen Effekt, während Thymuszelleextrakt inhibiert.

Anti-B-Kulturlymphoblastenserum wird durch Milzzelleextrakt stark, durch Thymuszelleextrakt nur leicht gehemmt.

Die Inkubation der Antiseren mit entsprechenden Mengen von Membranprotein aus Erythrozyten und Colonkarzinomzellen ergab keine Reduktion des zytotoxischen Titters.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsinhibition mit den Fraktionen der präparativen PAA-Disc-Elektrophorese sind in Abbildung 9 wiedergegeben. Dabei zeigte sich, daß die Fraktionen E2, E3, E4 und E6 die Zytotoxizität von Antimilzzellserum und Anti-Ductusthoracicus-Lymphozytenserum inhibieren. Diese Fraktionen waren mit denen identisch, die mit den oben genannten Antiseren präzipitierten. Darüberhinaus wurden niedermolare Proteine gefunden, die präzipitierten, aber keine Inhibition der Zytotoxizität zeigten.

4. Diskussion

Die Extraktion von Zellen mit Hilfe hyper-toner Salzlösung führt zur Gewinnung membran-assoziiierter Antigene in wasserlöslicher Form. Besonders intensiv wurden mit dieser Methode gewonnene Histokompatibilitätsantigene menschlicher und tierischer Lymphozyten studiert. Es gelang inzwischen, diese Antigene als gereinigtes und immunologisch aktives Material darzustellen(22). Sie sind in der Lage, im Zytotoxizitätssinhibitionstest die Reaktion von Antiseren gegen H-Antigene zu inhibieren. In der vorliegenden Arbeit wurde ein anderes Oberflächenantigen von Lymphozyten isoliert, nämlich das Rezeptorprotein für Antilymphozyten-Gammaglobulin. Das antigene Material wurde durch 3M KCl-Lösung aus Lymphozyten der Milz bzw. des Thymus extrahiert und durch Chromatographie an Sephadex G-200 bzw. durch präparative Trennung in der PAA-Disc-Elektrophorese soweit gereinigt, daß das Protein, das mit Antilymphozytenglobulin reagiert, isoliert werden konnte.

Diese Antigenpräparation ist ein lösliches Protein. Es sedimentiert nicht bei 110 000xg

über 60 Min. und kann durch Millipore-Filter (0,45 μ Porendurchmesser) filtriert werden.

In der PAA-Disc-Elektrophorese des gereinigten Antigens stellt sich das Protein als eine einzelne Proteinbande dar, die von zwei schwachen weiteren Banden begleitet wird, die durch die benutzte Methode nicht abgetrennt werden konnten.

Das Antigen ist immunologisch aktiv, d.h. es präcipitiert im Ouchterlony-Test mit xenogenen Antiseren gegen Lymphozytenantigene und es vermag deren Zytotoxizität für Lymphozyten zu inhibieren. Die Ergebnisse der PAA-Disc-Elektrophorese zeigen, daß die Präparation zur Aggregation neigt und sich am Übergang von Sammel- zu Trenngel niederschlägt.

Die Präcipitationsmuster des unfraktionierten Milzzellextraktes zeigen sechs verschiedene Präcipitationslinien mit einem Antiserum gegen Milzzellen. Dieses Antiserum wurde durch Immunisierung mit Milzzellen und durch Absorption mit Erythrozyten und Humanserum gewonnen. Antiseren gegen isolierte B- oder T-Zellpräparationen zeigen mit dieser Antigenpräparation nur zwei bis drei Präcipitationsreaktionen, die teilweise kreuzreagierten, teilweise aber nur bei den einzelnen Seren individuell auftraten. Dieser Befund

wurde durch Präcipitation bei verschiedenen Antigenkonzentrationen bestätigt. Er spricht für gemeinsame Antigene bei B- und T-Lymphozyten, aber auch für individuelle Antigene. Der Thymuszelleextrakt zeigt demgegenüber bei Diffusion gegen Antithymuszellserum eine Präcipitationsbande, die bei Präcipitation mit Antiseren gegen periphere Lymphozytenpräparationen und gereinigte B-Zellen nicht beobachtet wurde. Hier handelt es sich offensichtlich um ein individuelles Antigen an Thymuszellen, das an Lymphozyten der peripheren lymphatischen Organe, des Ductus thoracicus oder an B-Zellen nicht vorkommt. Darüberhinaus enthält der Thymuszelleextrakt auch Antigene, die mit Antiseren gegen periphere Lymphozyten reagieren.

Diese Ergebnisse wurden durch die Ergebnisse des Zytotoxizitätsinhibitionstests bestätigt. Bei Verwendung von Thymuszellen als Targetzellen zeigte Antigen, das aus Thymuszellen präpariert worden war, eine wesentlich stärkere inhibitorische Wirkung als Milzzellantigen. Der inhibitorische Effekt war auch stärker, wenn gereinigte T-Zellen des peripheren Blutes statt einer gesamten peripheren Lymphozytenpopulation verwendet wurden. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß

Thymuszellen ein Antigen enthalten, das bei Nicht-T-Zellen nicht vorkommt, allerdings auch bei den T-Zellen des peripheren Blutes und der lymphatischen Organe im Präzipitationstest nicht nachweisbar ist.

5. Zusammenfassung

Durch Extraktion mit 3 M Kaliumchloridlösung konnten Membranproteine aus Lymphozyten der Milz und des Thymus in Lösung gebracht werden. Diese Proteine ergaben mit Antilymphozytenserum Präzipitationsreaktionen und konnten die Zytotoxizität von Antilymphozytenserum hemmen. Dabei ergaben sich Unterschiede in der Wirkung von Milzzell- und Thymuszell-extrakt.

Durch Diffusionstrennung an Sephadex G 200 und durch präparative PAA-Disc-Elektrophorese konnten die Proteine des Milzzell-extraktes weiter differenziert werden. Diese getrennten Anteile wurden auf ihre präzipitierenden Eigenschaften und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, zytotoxische Reaktionen zu hemmen.

Präzipitierende Proteine fanden sich nach der

Trennung durch Gelfiltration in den Fraktionen F1 und F2. Inhibierende Proteine traten ausschließlich im hochmolekularen Bereich, der Fraktion F1, auf.

Bei präparativer elektrophoretischer Auftrennung fanden sich 6 präcipitierende Bereiche und 2 Fraktionen, die die Zytotoxizität von Antimilzserum und von Antiserum gegen *Ductus-thoracicus*-Lymphozyten deutlich hemmen konnten.

Im Gel wiesen die präcipitierenden Proteine sehr unterschiedliche Wanderungsstrecken auf, während die inhibierenden Proteine nur eine kurze Strecke in das Trenngel einwanderten.

Bei Verwendung von gereinigten T-Zellen ist die inhibitorische Wirkung beider Extrakte stärker. Bei Thymuszellen als Targetzellen stellt man eine Erhöhung des zytotoxischen Titers fest. Der Milzsellextrakt hat hier keinen inhibitorischen Effekt, während Thymuszellextrakt inhibiert. Anti-B-Kulturlymphoblastenserum wird durch Milzsellextrakt stark, durch Thymuszellextrakt nur leicht gehemmt.

Die Inkubation der Antiseren mit Membranproteinen aus Erythrozyten und Colonkarzinomzellen ergab keine Reduktion des zytotoxischen Titers.

Bei präparativer Auftrennung von Milzzellextrakt durch eine PAA-Disc-Elektrophorese zeigen die Fraktionen E2 und E3 einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Zytotoxizität von Antimilzserum (Abb.9, vgl. Abb.8 und Abb.3). Durch diese Fraktionen wurde auch Anti-Ductus-thoracicus-Lymphozytenserum gehemmt. Eine leichte Inhibition wiesen auch die Fraktionen E4 und E6 auf. Wie unter 3.3. dargelegt, ergaben diese Anteile (E2, E3, E4, E6) auch Präcipitationsreaktionen. Die ebenfalls präcipitierenden Fraktionen E10, E13 und E11 besaßen dagegen keine inhibitorische Aktivität.

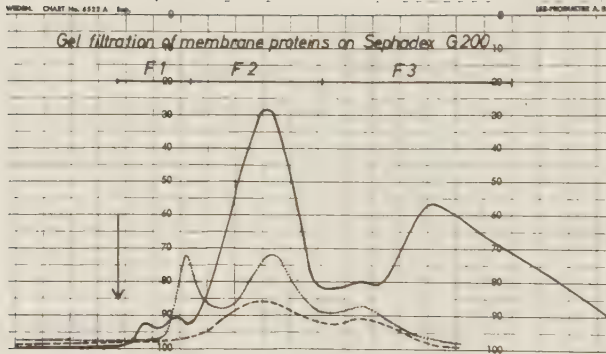


Abb.1: Elutionsmuster der Membranproteine von Milzzellen(—), Thymuszellen(.....) und Erythrozyten(---) nach Gelfiltration an Sephadex G 200 (Durchflußrate 15 ml/h). ↓ gibt das Maximum der Elution von Dextranblau(MG 2.000.000) an.

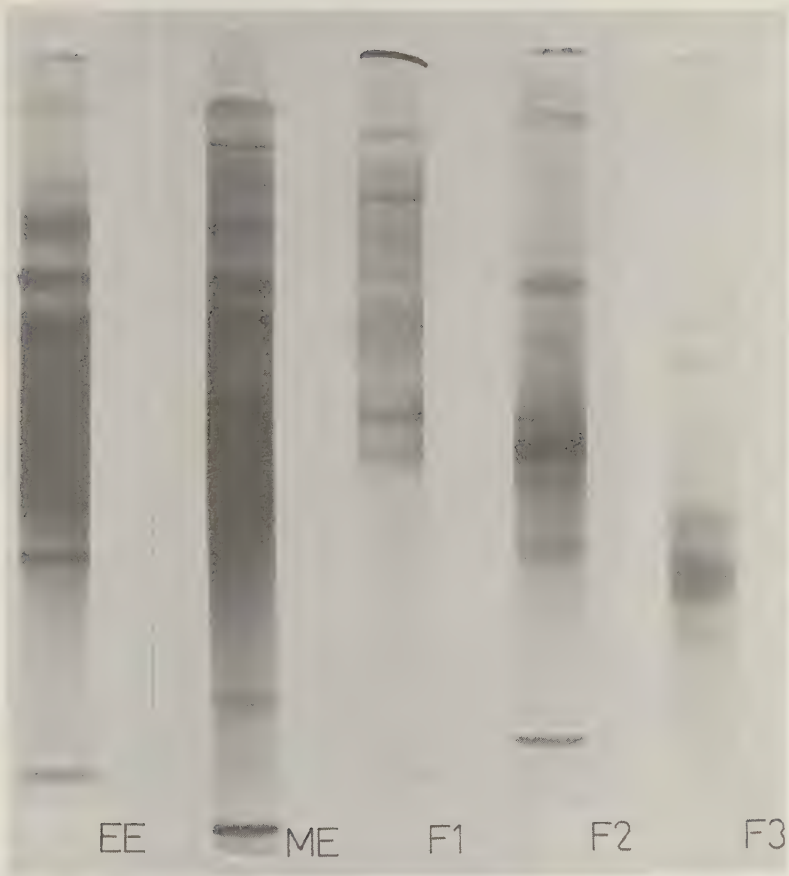


Abb.2: PAA-Disc-Elektrophorese des 3M KCl-Extraktes aus Erythrozytenmembranen(EE), von unfraktioniertem 3M KCl-Extrakt aus Milzzellen(ME) und den Fraktionen F1, F2, F3 des Milzzellenextraktes nach Gelfiltration in Sephadex G 200



Abb. 4: Disc-Elektrophorese von unfraktioniertem 3M KCl-Extrakt aus Milzzellen(ME) und den Fraktionen E2,E3,E4,E6,E10 und E13, die durch Elution aus Gelschnitten der PAA-Elektrophorese gewonnen wurden.

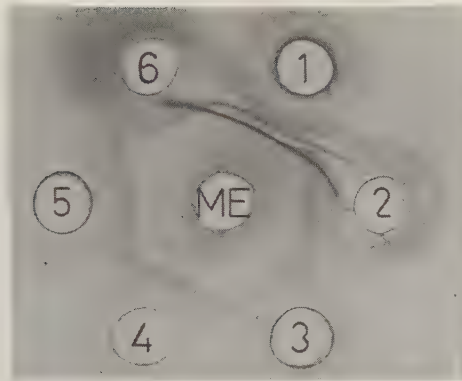


Abb.4: Immunpräzipitation von Milzzelleextrakt(ME) mit Antisera gegen Milzzellen(1),Thymuszellen(2),Ductus-thoracicus-Lymphozyten(3,6),Lymphknotenzellen(4) und B-Kulturlymphoblasten(5)

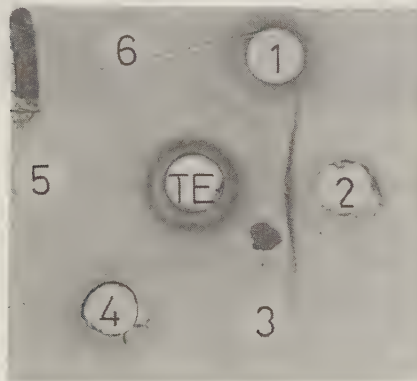


Abb.5: Immunpräzipitation von Thymuszelleextrakt(TE) mit Antisera gegen Milzzellen(1),Ductus-thoracicus-Lymphozyten(3,6),Thymuszellen(2),Lymphknotenzellen(4) und B-Kulturlymphoblasten(5)

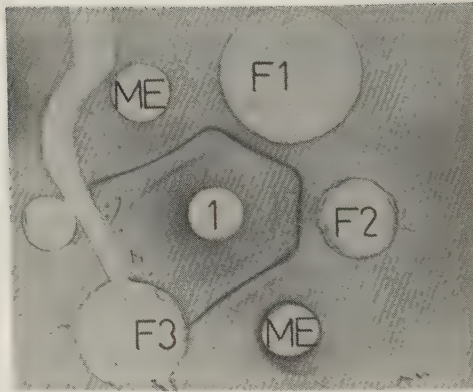


Abb.6: Immunpräzipitation von unfraktioniertem Milzzellextrakt (ME) und den durch Gelfiltration an Sephadex G 200 getrennten Fraktionen F1, F2 und F3 mit einem Antiserum gegen Milzzellen

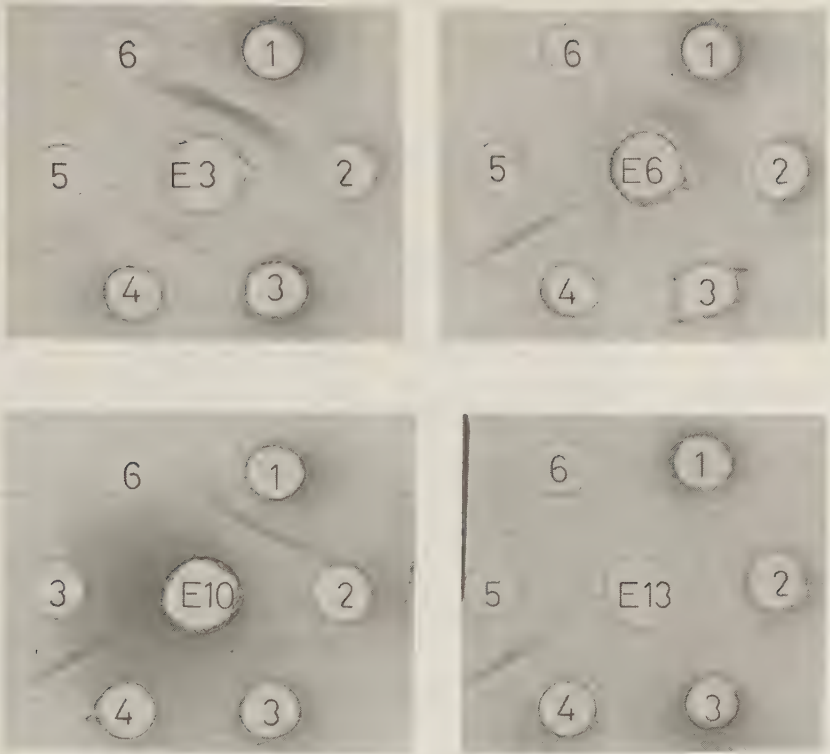


Abb.7: Immunpräzipitation der durch Elution aus Gelstücken gewonnenen Fraktionen E3, E6, E10 und E13 mit Antiseren gegen Milzzellen(1), Thymuszellen(2), Ductus-thoracicus-Lymphozyten(3,6), Lymphknotenzellen(4) und Antiimmunglobulinserum(5)

target cell	anti serum	antigen	-log 2 anti serum dilution														
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
lymphocytes of peripheral blood	anti- spleen cell serum	without antigen															
		unfract. spleen cell extract															
		F 1															
		F 2															
		F 3															
		unfract. thymus cell extract															
		erythrocyte membrane extract															
		colon carcinom cell extract															
T-lymphocytes		without antigen															
		unfract. spleen cell extract															
		unfract. thymus cell extract															
thymus cells		without antigen															
		unfract. spleen cell extract															
		unfract. thymus cell extract															
lymphocytes of peripheral blood	anti- B-lymphocytes serum	without antigen															
		unfract. spleen cell extract															
		unfract. thymus cell extract															
T-lymphocytes	anti thymus cell serum	without antigen															
		unfract. spleen cell extract															
		unfract. thymus cell extract															
		erythrocyte membrane extract															
		without antigen															
		unfract. spleen cell extract															
thymus cells		unfract. thymus cell extract															
		without antigen															
		unfract. spleen cell extract															
lymphocytes of peripheral blood	anti thoracic duct lymphocytes serum	without antigen															
		unfract. spleen cell extract															
		unfract. thymus cell extract															
lymphocytes of peripheral blood	anti lymphnode cell serum	without antigen															
		unfract. spleen cell extract															
		unfract. thymus cell extract															

Abb.8: Inhibition der Zytotoxizität von Antilymphozytenseren nach Inkubation mit 3M KCl-Extrakten von Milzzellen, Thymuszellen, Erythrozytenmembranen und Colonicarcinomzellen und den durch Gelfiltration an Sephadex G 200 getrennten Fraktionen F1, F2, F3 des Milzzelleextraktes

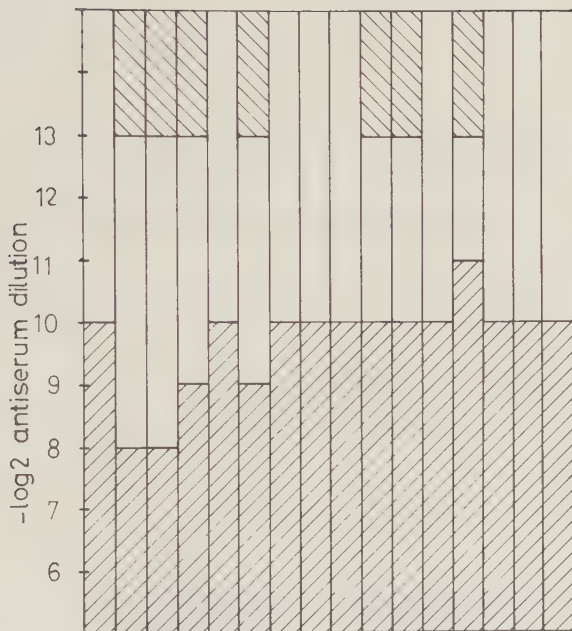


Abb.9: Inhibition der Zytotoxizität von Anti-Milzzellserum durch Fraktionen des Milzzellextraktes, die in der PAA-Disc-Elektrophorese getrennt und aus den Gelstücken eluiert wurden.

///// gibt den zytotoxischen Titer an,

\\\\\\\\ kennzeichnet die präcipitierenden Fraktionen

LITERATURVERZEICHNIS

1. MEDAWAR, P.D.

The use of antigenic tissue extracts to
weaken the immunological reaction against
skin homografts in mice
Transplantation 1, 21 (1963)

2. KAHAN, B.D. und REISFELD, R.A.

Isolation of soluble transplantation an-
tigen
Proc.Nat.Sci.U.S. 53, 153 (1965)

3. HAENEN, A.M., DEGIOVANNI, G., CASTERMANS, A.,
LEJEUNE, G. in "Advance in transplantation"
(J.DAUSSET, J.HAMBURGER, G.MATHE), S.289-293,
Munksgaard, Copenhagen

4. KAHAN, B.D. und REISFELD, R.A.

Electrophoretic purification of water-
soluble guinea pig transplantation anti-
gen
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 58, 1430 (1967)

5. KAHAN, B.D. und REISFELD, R.A.

Differences in the amino acid compositions

of allogenic guinea pig transplantation
antigens

J.Immunol. 101,237 (1968)

6. REISFELD,R.A.,PELLEGRINO,M.,PAPERMASTER,B.W.
und KAHAN,B.D.

HL-A antigens from a continuous lymphoid
cell line derived from a normal donor

J.Immunol. 104,560 (1970)

7. REISFELD,R.A. und KAHAN,B.D.

Transplantation antigens

Advanc.Immunol. 12,117 (1970)

8. HAUGHTON,G.

Extraction of H-2 antigen from mouse tumour
cells

Transplantation 2,251 (1964)

9. NATHENSON,S.G. und DAVIES,D.A.L.

Solubilization and characterisation of
mouse histocompatibility antigens from
membran derived lipoprotein

Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 56,476 (1966)

10. DAVIES,D.A.L.

Mouse histocompatibility isoantigens de-

rived from normal and from tumour cells
Immunology 11, 115 (1966)

11. SANDERSON, A.R. und BATCHELOR, J.R.
Transplantation antigens from human spleen
Nature 219, 184 (1968)
12. EDIDIN, M.
Preparation of single soluble antigens of
the mouse histocompatibility-2 complex
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 57, 1226 (1967)
13. SHIMADA, A. und NATHENSON, S.G.
Murine histocompatibility alloantigens;
purification and some chemical properties
of soluble products from H-2b and H-2d ge-
notyps released by papain digestion of
membran fractions
Biochemistry 8, 4048 (1969)
14. KANDUTSCH, A.A.
Intracellular distribution and extraction
of tumour homograft enhancing antigens
Cancer Res. 20, 264 (19607)
15. HILGERT, I., KANDUTSCH, A.A., CHERRY, M. und
SNELL, G.D.
Fractionation of murine H-2 antigens with

- the use of detergents
Transplantation 8,451 (1969)
16. METZGAR, R.J., FLANAGAN, J.F. und MENDES, N.F.
in "Histocompatibility Testing" (E.J.CUR-
TONI, P.L.MATTIUZ und R.M.TOSI), S.307-313,
Munksgaard, copenhagen (1967)
17. MANSON, L.A. und PALM, J. in "Histocompati-
bility Testing" (E.J.CURTONI, P.L.MATTIUZ
und R.M.TOSI), S.301-304, Munksgaard,
Copenhagen (1967)
18. HARRIS, T.N., HARRIS, S. und OGBURN, C.A.
Relation of butanol-solubilized rabbit hi-
stocompatibility antigens to the suppression
of antibody-producing allogenic lymph node
cells
Tranplantation 6,437 (1968)
19. MADDY, A.H.
The solubilization of the protein of the ex-
erythrocyte ghost
Biochim.Biophys.Acta 88,448 (1964)
20. REISFELD, R.A., PELLEGRINO, M.A. und KAHAN, B.D.

Salt extraction of soluble HL-A antigens
Science 172,1134 (1971)

21. REISFELD, R.A. und KAHAN, B.D.

Biological and chemical characterisation
of human histocompatibility antigens
Fed.Proc. 29,2034 (1970)

22. GÜTZE, D. und REISFELD, R.A.

Immunogenicity and partial purification
of soluble H-2 antigen extracted with hyper-
tonic salt
J.Immunol. 112,1643 (1974)

23. GUIDOTTI, C.

Membrane proteins
Ann.Rev.Biochem. 41,731 (1972)

24. MAURER, H.R.

in "Diskelektrophorese", S.42 - 43,
Berlin(West) (1968)

25. CALDWELL, R.G. und PIGMAN, W.

Discelectrophoresis of human saliva in
polyacrylamid gel
Arch.Biochem.Biophys. 110,91 (1965)

26. CLARKE, J.T.
Simplified "disc"(polyacrylamid gel) electrophoresis
Annals N.Y. Acad.Sci. 121,428 (1964)
27. OUCHTERLONY, Ö.
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis
Progr.Allergy 5,1 (1958)
28. JULIUS, M.H., SIMPSON, E. und HERZENBERG, L.A.
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes
Europ.J.Immunol. 3,645 (1973)
29. MURPHY, J.B., KIES, M.W.
Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions
Biochim.Biophys.Acta 45,382 (1960)
30. MELTZER, M.S., LEONARD, J.L., RAPP, H.J. und BORSOS, T.
Tumour-specific antigen solubilized by hypertonic potassium chloride
J.Nat.Cancer Inst. 47,703 (1971)

31. LAY, W.H., MENDES, N.F., BIANCO, C. und
NUSSENZWEIG, V.

Binding of sheep red blood cell to a large
population of human lymphocytes

Nature 230, 531 (1971)

Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Herrn Professor Dr. H. Warnatz meinen Dank auszusprechen, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Dr. H. J. Aschoff danke ich aufs herzlichste für die stete Beratung und Unterstützung.

Für die freundliche Zusammenarbeit bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des immunologischen Labors.

Lebenslauf

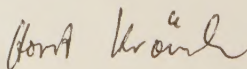
Am 10. August 1949 wurde ich, Horst-Rüdiger Hilmar Krömker, als Sohn des prakt. Tierarztes Dr. Fritz Krömker und seiner Ehefrau Elly, geb. Bauer, in Hirschau, Landkreis Amberg, geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Hirschau. 1959 wechselte ich zum Humanistischen Gymnasium Amberg. 1963 trat ich in das Humanistische Gymnasium Forchheim ein, wo ich am 22. Juli 1968 das Reifezeugnis erhielt.

Im November 1968 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg das Studium der Humanmedizin. 1969 legte ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, 1971 die Ärztliche Vorprüfung ab. Am 19. August 1974 schloß ich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen ab.

Im Oktober 1974 war ich im Institut und Poliklinik für klinische Immunologie als Medizinalassistent beschäftigt. In diesem Institut arbeitete ich auch von November 1974 bis November 1975 mit Hilfe eines Stipendiums nach dem Graduiertenförderungsgesetz an meiner Doktorarbeit. Zur Zeit leiste ich meine Ausbildungszeit als Medizinalassistent ab.

Erlangen, im März 1976



(Horst-Rüdiger Hilmar Krömker)

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hugi, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990